

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de Septiembre de 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/068654 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: C12N 15/33

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU02/00001

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de Febrero de 2002 (22.02.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
57/2001 28 de Febrero de 2001 (28.02.2001) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Ave. 31 entre 158 y 190,
Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): IGLESIAS
PEREZ, Enrique [CU/CU]; Edif. 25 Apto. 103, Reparto
"Camilo Cienfuegos", Habana del Este, Ciudad de La
Habana 11700 (CU). VAZQUEZ BLOMQUIST, Dania,
M. [CU/CU]; Calle 49 No. 2805 entre 28 y 49A, Kohly,
Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU). DUARTE
CANO, Carlos, A. [CU/CU]; Ave. 31 No. 18207 entre
182 y 184, Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(74) Mandatario: VAZQUEZ CASTILLO, Mariela; Depar-
tamento de Patentes, Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán,
Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada mue-
vamente cuando se reciba dicho informe

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: RECOMBINANT POXVIRUS FOR CHIMERIC PROTEINS OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

(54) Título: POXVIRUS RECOMBINANTES PARA PROTEINAS QUIMERICAS DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA

(57) Abstract: The invention relates to HIV chimeric genes formed by the union of fragments of different genes of said virus,
wherein said fragments contain epitopes for cytotoxic T cells (CTL) or HTV-1 auxiliary T cells, which are presented by a wide range
of antigens of type 1 Major Human Histocompatibility System (HLA-1). Recombinant poxvirus are obtained from said genes, which
are useful for prophylactic and therapeutic vaccination against HIV/AIDS infection, are capable of generating a protective immune
cell response in vaccinated laboratory animals and are recognized by the CTL lymphocytes of HIV/AIDS patients.

(57) Resumen: Se describen genes quiméricos del VIH formados por la unión de fragmentos de diferentes genes de este virus,
donde estos fragmentos contienen epitopos para células T citotóxicas (CTL) o T auxiliaadoras del VIH-1, los cuales son presentados
por una amplia gama de antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad Humano tipo 1 (HLA-1). A partir de estos genes
se obtienen poxvirus recombinantes útiles en la vacunación profiláctica y terapéutica contra la infección por VIH/SIDA capaces de
generar una respuesta inmune celular protectora en animales de laboratorio inmunizados y siendo reconocidos por los linfocitos CTL
de pacientes de VIH/SIDA.

WO 02/068654 A2

B10

POXVIRUS RECOMBINANTES PARA PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Sector Técnico

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología y en particular con el desarrollo de vacunas para la prevención y el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En esta aplicación se describe y reivindican Virus de Viruela Aviar recombinantes para proteínas quiméricas del VIH útiles en la vacunación profiláctica y terapéutica contra la infección por VIH/SIDA

10 Técnica Anterior

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente etiológico del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Popovic M, Sarngadharan M, Read G, and Gallo RC. Science 1984, 224:497-500). Este virus es capaz de infectar no sólo los linfocitos T4+ (Klatzman D, Barre Sinoussi F, Nugeyre MT, Dauguet C, Vilmer E, Griscelli C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Gluckman, JD, Chermannn JC and Montagnier L. Science 1984, 225:59-63), sino también otros tipos de células como macrófagos, células de tejido nervioso y epitelial.

El VIH puede permanecer oculto al sistema inmune del hospedero por un largo período de tiempo, a pesar de que se desarrollan niveles elevados de anticuerpos. Esta infección ocasiona un deterioro paulatino de los mecanismos de defensa inmunológica, convirtiendo al organismo infectado en blanco de una serie de infecciones oportunistas que lo conducen a la muerte.

Se estima que hasta el año 2000 existían en el mundo más de 34.3 millones de personas infectadas por el (VIH). Alrededor del 94% de las 16 000 nuevas infecciones diarias ocurren en países del tercer mundo (UNAIDS. Report on the global HIV/AIDS epidemic, June 2000).

Debido a las alarmantes proporciones que ha alcanzado esta pandemia y la ausencia de un tratamiento efectivo, existe una necesidad urgente en el mundo de una vacuna efectiva contra este agente.

Dentro del conjunto de características del VIH que dificultan esta tarea, la más importante es la variabilidad de sus proteínas, especialmente la glicoproteína externa de la envoltura gp120. En esta radican los principales sitios vinculados al proceso infectivo y que constituyen, por tanto, los blancos primarios para la neutralización viral mediada por anticuerpos.

Las vacunas basadas en anticuerpos neutralizantes han demostrado la factibilidad de generar una respuesta protectora contra el VIH en chimpancés (Berman PW, Gregory TJ, Lavon R, Nakamura GR, Champe MA, Porter JP, Wurm FM, Hershberg RD, Cobb GK and Eichberg JW. *Nature* 1990, 345: 622-625; Girard M, Kieny MP, Pinter A, Barre-Sinoussi F, Nara P, Kolbe H, Kusumi K, Chaput A, Rainhart T, Muchmore E, Ronco J, Kaczorek M, Gomard E, Gluckman JC and Fultz PN, *PNAS* 1991, 88: 542-546). No obstante en estos experimentos los ensayos de reto han sido realizados en condiciones ideales, en las que la ruta, forma y cantidad total de virus inoculado fueron diferentes a las que se pueden esperar en una infección natural. Además, no se ha demostrado que estos inmunógenos protejan contra la infección por aislamientos virales divergentes y los anticuerpos generados por estas vacunas no han sido capaces de neutralizar aislamientos primarios de VIH.

Diferentes candidatos vacunales se han evaluado en ensayos clínicos fase 1 y 2 (Johnston MI. *AIDS vaccine development: status and future directions*. 1999. XII Colloque des Cent Gardes. Ed. Girard M and Dodet B. 161-163). La mayoría de estos candidatos están basados en las glicoproteínas de la envoltura viral: gp160 y gp120. El empleo de estas proteínas recombinantes no garantiza que se genere una respuesta contra los diferentes aislamientos virales existentes y los datos de inmunogenicidad conocidos hasta el presente han sido discretos. Dos candidatos vacunales basados en gp120 recombinante se están evaluando actualmente en ensayos clínicos de Fase III en Tailandia y USA.

Por las limitantes que en la práctica ha presentado la obtención de vacunas que estimulen una amplia respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el VIH y capaz de neutralizar aislamientos primarios, en los últimos años se le está confiriendo mayor atención a los inmunógenos que sean capaces de

estimular la respuesta CTL y en especial la respuesta de células T citotóxicas contra antígenos del VIH.

- La administración de un anticuerpo monoclonal anti CD8 a macacos inoculados con el virus SHIV aumenta significativamente los niveles de viremia (Matano T, Shibata R, Simeón C, Connors M, Lane C, Martín M, Administration of an Anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric Simian/Human Immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques, J Virol, 1998, 72, 1: 164-169); se ha reportado protección en ratones R"SCID" repoblados con PBMC de personas inmunizadas con vaccinia gp160 en ausencia de anticuerpos neutralizantes (Van Kuyk R, Torbett B, Gulizia R et al, Human CTL specific for the nef protein of HIV protect hu-PBL-SCID mice from HIV infection. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993; 9 (suppl 1):S77); personas seronegativas con alto riesgo de infección muestran respuesta celular anti VIH. Ej trabajadoras del sexo en Africa (Rowland-Jones SL, J Sotton, K Ariyoshi, T Dong, F Gotch, s McAdams, D Whitby, S Sabally, A Gallimore, T Corrah, M Takiguchi, T Schltz, A McMichael, H Whittle. 1995. HIV-specific cytotoxic T cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. Nature Medicine, 1: 59-64) y niños sanos de madre seropositivas (Rowland-Jones SL, DF Nixon, MC Aldhous, F Gotch, K Aroyoshi, N Hallam, JS Kroll, K Froebel, A McMichael. HIV specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. Lancet, 1993, 341: 860-861).

- Adicionalmente individuos no progresores de larga duración exhiben una fuerte respuesta CTL (Cao, Y, Qin L, Zhang I, Safrit J and Ho DD, New Engl J Med, 1995, 332:201-208; Riviere Y, McChesney MB, Porrot E, et al. AIDS Res Hum Retroviruses, 11:903-990); la respuesta CTL precede a los anticuerpos neutralizantes en el curso natural de la infección y ha sido asociada al control de la viremia en la primera fase de la infección (Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al, Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency síndrome, J Virol, 1994; 68: 4650-4655) y la velocidad de progresión a SIDA ha sido asociada con el deterioro de la respuesta CTL (Harrer T, Harrer E, Kalams S, Elbeik T, Staprans S, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD, Yilma T,

Caliendo A, Jonson RP, Buchbinder S, and Walker B. HIV-specific CTL-response in healthy long-term asymptomatic HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1996, 12, 7: 585-592).

Diferentes opciones metodológicas se han empleado en animales o en
5 estudios clínicos en humano para generar respuesta CTL. La variante más eficiente hasta el momento es el empleo de los llamados vectores vivos.

El principio de esta metodología consiste en emplear virus o bacterias inocuos para transportar hacia el interior de las células humanas los genes del patógeno (en este caso del VIH) y producir allí las correspondientes
10 proteínas. Esta forma de introducción de los antígenos al sistema inmune maximiza la presentación de los péptidos en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y, por tanto, la estimulación de clones de linfocitos CD8+ con actividad citotóxica.

Entre los microorganismos empleados con esos fines se encuentran los
15 poxvirus (familia Poxviridae). El representante más conocido de esta familia es el virus vaccinia (VV), que fuera empleado exitosamente en la campaña de vacunación que permitió en 1977 erradicar la viruela.

Se han efectuado varios ensayos clínicos con VV que expresan proteínas del VIH (Corey L, McElrath J, Weihold K, Matthews T, Stablein D, Graham B,
20 Keefer M, Schwartz D, Gorse G. Cytotoxic T Cell and Neutralizing Antibody Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope with a combination vaccine regimen. *J Infectious Dis*, 1998, 177:301-9; Graham BS, Matthews TJ, Belshe R, Clements ML, Dolin R, Wright PF, Gorse GJ, Schwartz DH, Keefer MC, Bolognesi DP, Corey L, Stablein D, Esterlitz JR, Hu
25 SL, Smith GE, Fast P, Koff W, *J Infectious Dis*, 1993, 167: 533-7). Estos vectores presentan dos limitaciones importantes para su uso en humanos: (1) En un porcentaje de los vacunados se observan reacciones adversas importantes y (2) las personas con respuesta inmune previa contra vaccinia responden pobremente contra el antígeno heterólogo.

30 Para solventar estas dificultades se han desarrollado en la última década los Avipoxvirus como vectores vivos. Estos son Poxvirus cuyo rango de hospedero está limitado a las aves y su ciclo replicativo es abortivo en células

de mamíferos. Dentro de los avipoxvirus se ha experimentado con los Virus de la Viruela de Canarias (VVC) y el Virus de la Viruela Aviar (VVA).

Avipoxvirus recombinantes para diferentes patógenos en humanos o antígenos tumor asociados han demostrado su capacidad para inducir
5 respuesta celular en animales (Limbach KJ, and E Paoletti. 1996. Non-replicating expression vectors: applications in vaccines development and gene therapy. *Epidemiol. Infect.* 116:241-256). El uso de Avipoxvirus recombinantes ha sido objeto de dos patentes concedidas en USA (Paoletti E. y cols 1992 US5174993, Paoletti E. y cols 1993, US5505941) y
10 específicamente avipoxvirus recombinantes para antígenos de lentivirus son la base de una solicitud de patente en Europa (Paoletti E y cols, EP0956360)

Un VVC recombinante para los genes gag, pol y env del VIH ha sido evaluado en estudios de fase I y II en voluntarios sanos (Clements-Mann ML, K Weinhold, TJ Matthews, BS Graham, GL Gorse, MC Keefer, MJ McElrath,
15 R-H Hsieh, J Mestecky, S Zolla-Pazner, J Mascola, D Schwartz, R Siliciano, L Corey, PF Wright, R Belshe, R Dolin, S Jackson, S Xu, P Fast, MC Walker, D Stablein, J-L Excler, J Tartaglia, A-M Duliege, F Sinangil, E Paoletti. 1998. Immune responses to Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 induced by Canarypox expressing HIV-1MN gp120, HIV-1SF2 recombinant gp120, or
20 both vaccines in seronegative adults. *J Infect Dis* 177: 1230-1246; Egan MA, WA Pavlat, J Tartaglia, E Paoletti, KJ Weinhold, ML Clements, RF Siliciano. 1995. Induction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)- specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range-restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1MN env
25 gene. *J Infect Dis* 171: 1623-1627). En estos estudios se ha documentado la aparición de respuesta CTL contra al menos una proteína del VIH, en al menos un ensayo, en un porcentaje de las personas que va desde el 50% en el primer estudio de Fase I hasta el 30% en la Fase II y menos de un 10% en el último estudio de fase I realizado en Uganda. Este CP recombinante
30 vCP205 presenta inserciones de genes del VIH en tres regiones no esenciales del virus con el objetivo de lograr una respuesta contra diferentes blancos virales.

Por su parte el VVA ha sido también empleado para inducir respuesta CTL contra antígenos del VIH en combinación con inmunización con ADN (Robinson HL, DC Montefiori, RP Johnson, KH Manson, ML Kalish, JD Lifson, TA Rizvi, S Lu, S-L Hu, GP Mazzara, DL Panicali, JG Herndon, R Glickman, MA Candido, SL Lydy, MS Wyand and HM McClure. 1999. Nature Medicine, 5: 526-534).

Esta combinación de inmunógenos logró algún nivel de protección en el modelo de infección de macaca nemestrina por VIH-1 (Kent SJ, A Zhao, SJ Best, JD Chandler, DB Boyle, IA Ramshaw. Enhanced T-Cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of a consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. 1998. J Virol, 72: 10180-10188). Este modelo presenta limitaciones importantes ya que la infección en esta especie es muy ineficiente y poco reproducible.

Por otra se ha demostrado la factibilidad de lograr respuesta CTL mediante la inmunización con minigenes compuestos por una sucesión de epitopos CTL discretos de varios patógenos (Whitton, L, Sheng N, Oldstone MB, and McKee T. A "string of beads" vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge, J Virol, 1993, 67, 1:348-352; A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-Lymphocyte and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. J Virol, 71, 3: 2292-2302).

Específicamente para el VIH, el grupo de Andrew McMichael en Oxford ha utilizado el virus Vaccinia cepa Ankara Modificada (MVA) recombinante para minigenes y el gen gag para lograr respuesta CTL en ratones compuestos por epitopos CTL individuales del VIH-1 (Hanke T, RV Samuel, TJ Blanchard, VC Neumann, TM Allen, JE Boyson, SA Sharpe, N Cook, GL Smith, DI Watkins, MP Cranage, AJ McMichael. 1999. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-Modified Vaccinia Virus Ankara boost vaccination regimen. J Virol, 73, 9: 7524-7532). Estos minigenes

consisten en una sucesión de epitopos CTL individuales del gen gag de diferentes cepas.

- Esta variante tiene la desventaja de que los epitopos CTL individuales solo cubren un conjunto limitado de alelos de HLA por lo que la respuesta contra estos minigenes es por definición muy restringida.

Descripción de la invención

- La esencia de esta invención consiste en la construcción de genes quiméricos compuestos, por regiones ricas en epitopos CTL individuales del VIH, donde estas regiones son seleccionadas de proteínas internas conservadas o de proteínas reguladoras que se expresan tempranamente en el ciclo viral.

- Esta solución ofrece ventajas en comparación con los minigenes ya descritos, pues permite el procesamiento simultáneo de múltiples epitopos CTLs, que muchas veces se sobrelapan en estas regiones, y son presentados por una amplia gama de alelos de HLA, mientras que los minigenes presentan un número reducido de epitopos CTLs individuales y, por tanto, es de esperar que muestren una mayor restricción de la respuesta por los alelos de HLA. Otras ventajas de esta solución son que concentra en un mismo gen las regiones más relevantes de varias proteínas, lo cual simplifica la obtención de los virus recombinantes; evita el empleo de varios genes de resistencia a antibióticos en un mismo virus o de otros marcadores irrelevantes y ofrece más opciones para la combinación de epitopos correspondientes a diferentes subtipos del VIH dentro de un mismo preparado vacunal. Las regiones escogidas pertenecen a las proteínas estructurales más conservadas del virus y a proteínas reguladoras de expresión temprana. Estas regiones ricas en epitopos CTL van acompañadas por varios epitopos para células T auxiliaadoras (Th) procedentes de regiones conservadas del VIH y separados entre sí por dos lisinas con el objetivo de facilitar su procesamiento por proteasas intracelulares. A estas proteínas quiméricas se le agrega, además, un epitopo reconocido por un anticuerpo monoclonal para facilitar su detección por métodos inmunoquímicos.

- El gen quimérico se ensambla primero a partir de fragmentos de genes obtenidos unos por síntesis química y otros amplificados por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) con oligonucleótidos específicos a partir del

genoma de VIH. Los diversos fragmentos son clonados unos a continuación de otros en un plasmidio adecuado y, luego de ensamblado, el gen se traslada a un vector de recombinación en poxvirus. Los fragmentos se escogen dentro de las regiones más conservadas de las proteínas
5 estructurales del VIH que contienen una alta concentración de epitopos CTL contra diferentes HLA humanos o las proteínas reguladoras que se expresan tempranamente en el ciclo replicativo del VIH.

Más particularmente esta invención se refiere al gen *cr3* que contiene epitopos de células Th de gp120, gp41 y vpr, el epitopo V3 de la cepa MN
10 reconocido por el AcM 2C4 (Duarte CA, Pérez L, Vázquez J, Dueñas M, Vilarubia OL, Navea L, Valdés R, Reyes O, Montero M, Ayala M, and Gavilondo J. Epitope mapping, V region DNA sequence, and neutralizing Fab fragments of two monoclonal antibodies against the HIV-1 V3 loop. Immunotechnology 1996, 2:11-20) y regiones ricas en epitopos CTL de las
15 proteínas RT, Gag y Nef.

Estos genes quiméricos son preferentemente insertados en el genoma de un vector vivo bacteriano o viral (ej poxvirus, herpesvirus, alfavirus, poliovirus, adenovirus, BCG, Salmonella) siendo este vector preferentemente un poxvirus, y aún más específicamente un Avipoxvirus, y estos vectores vivos
20 recombinantes son empleados para inducir una respuesta de inmune de tipo TH1 y actividad de células T citotóxicas contra el VIH en animales o humanos.

Más específicamente esta invención se refiere a Virus de Viruela Aviar recombinantes para estas proteínas quiméricas y en particular a las cepas de VVA denominadas FPCR3 y FPSCR3gpt que contienen el gen quimérico *cr3*.
25 Una vez ensamblado de la forma descrita, el gen *cr3* se clona en un plasmidio de recombinación en Poxvirus, en particular en un plasmidio para recombinación en Virus de Viruela Aviar. Particularmente en este caso se emplearon los plasmidios pEFL29 y pFP67xgpt. El pEFL29 presenta regiones de homología con el fragmento terminal BamHI de 6kb del genoma del VVA, las
30 que flanquean una unidad transcripcional en la cual el gen heterólogo es insertado bajo el promotor 7.5K de VV, y que contiene, además, el gen reportero LacZ bajo el control del promotor tardío 4b del VVA. El pFP67xgpt presenta como regiones de homología los marcos de lectura abiertos 6 y 7

de la región de 11.2 kb BamHI que flanquean una unidad transcripcional en la cual el gen heterólogo es insertado bajo un promotor sintético E/L de poxvirus y presenta el marcador gpt que confiere la resistencia al ácido micofenólico el cual permite realizar la selección de los virus recombinantes.

- 5 Los plasmidios resultantes se denominaron pFPCR3 y pFPSCR3gpt respectivamente. Estos plasmidios son transfectados en un cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) para lo cual se pueden emplear diversas técnicas. En este caso en particular la transfección se realiza con lipofectina (Sigma, USA) en células previamente infectadas con la cepa FP29
- 10 de VVA pero igualmente pueden emplearse otros métodos alternativos como la electroporación y el DEAE Dextrán, entre otros. Como resultado de la recombinación homóloga entre el plasmidio y las regiones de homología en la región no esencial de VVA se obtienen virus recombinantes que expresan B galactosidasa en el caso del pFPCR3 o son resistentes al ácido micofenólico
- 15 en el caso del pFPSCR3gpt, lo cual permite su selección y purificación a través de diferentes pases en FEP. La presencia del gen en los virus seleccionados puede ser verificada mediante RCP con oligonucleóticos específicos y la expresión de la proteína se puede demostrar por Western Blot.
- 20 Esta invención incluye también el uso de los VVA recombinantes así obtenidos para inducir una respuesta inmune de tipo TH1 y con actividad CTL en ratones Balb/C en combinación con una formulación farmacéuticamente aceptada, seleccionada entre alguna de las conocidas en el estado del arte.
- 25 Esta invención también se refiere a una combinación terapéutica o preventiva de VVA recombinantes para los genes quiméricos descritos y en particular los virus FPCR3 y FPSCR3gpt, con la administración de diversas sustancias inmunopotenciadoras que forman parte del estado del arte, y en especial de citocinas como la IL2, IL12, IFN γ , GMSCF, GSCF, entre otras, que estimulan
- 30 preferentemente la respuesta inmune de tipo TH1.

Particularmente las combinaciones de los virus FPCR3 y FPSCR3gpt con IL2 pueden ser efectivas al administrar dosis diarias de IL2 en un rango entre 10^2 y

10⁶ unidades internacionales en animales o humanos. La administración diaria de IL2 en ratones Balb/c potencia la respuesta inmune celular de los VVA. Alternativamente la IL2 puede ser administrada solamente el día de la inoculación o el día de la inoculación y el anterior y el posterior a la misma.

- 5 Aunque se refiere particularmente al gen quimérico *cr3*, está en la esencia de esta invención que pueden seleccionarse otros fragmentos ricos en epitopos CTL del VIH, o fragmentos equivalentes a los incluidos en *cr3* provenientes de otras cepas las cuales pueden pertenecer a cualquiera de los subtipos virales.

10 Igualmente aunque se refiere particularmente a la cepa FP9 del VVA, está en la esencia de esta invención que pueden ser empleadas otras cepas de VVA para construir los virus recombinantes, así como otros avipoxvirus como el Canarypox, otros poxvirus como Vaccinia o MVA u otros virus como herpesvirus, alfavirus, adenovirus, poliovirus o bacterias como BCG o Salmonella.

- 15 En otro objeto de la presente invención el gen puede ser clonado en un plasmidio adecuado para su expresión en células de mamíferos. Estos plasmidios pueden ser empleados para inducir respuesta inmune de tipo TH1 y actividad de células T citotóxicas contra el VIH en animales o humanos en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptado.

- 20 En aún otro aspecto de la invención también se incluye combinaciones terapéuticas o preventivas de plasmidios de expresión en células de mamíferos que expresan la proteína CR3, con las sustancias inmunopotenciadoras señaladas en el párrafo anterior u otras como liposomas, polisacáridos, lipopéptidos, lípidos, o proteoliposomas.

- 25 En aún otro aspecto de esta invención estos genes quiméricos pueden ser clonados en otros plasmidios de expresión y las proteínas codificadas por los mismos pueden ser producidas en bacterias o levaduras; en células de mamíferos o insectos, en plantas o en la leche de animales transgénicos. Las proteínas así obtenidas podrían ser empleadas también para inducir respuesta
30 inmune de tipo TH1 y actividad de células T citotóxicas contra el VIH en animales o humanos

En otro aspecto de la invención también se incluyen combinaciones terapéuticas o preventivas de la proteína CR3, las sustancias inmunopotenciadoras señaladas en el párrafo anterior u otras tales como liposomas, polisacáridos, proteoliposomas o adyuvantes de diferentes tipos como adyuvantes oleosos, saponinas u otros capaces de potenciar la respuesta inmune de tipo TH1 y actividad de células T citotóxicas contra el VIH en animales o humanos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Plasmidio pEFL-cr3, para la recombinación homóloga con el FP9 usando el ORF-1 de la región terminal BamHI de 6kb como sitio de inserción. El gen cr3 queda bajo el control del promotor p7.5K y el gen reportero LacZ bajo el 4b de VVA.

Figura 2. Plasmidio pFP67xgpt, para la recombinación homóloga con el FP9 usando la región entre los ORF-6 y 7 de la región 11.2 kb BamHI como sitio de inserción. El gen cr3 queda bajo el control de un promotor sintético E/L y el gen reportero Ecogpt bajo el control del promotor p7.5K.

Figura 3. (A) RCP y (B) Western blot de tres VVA recombinantes para CR3 independientes: (1) FPCR3.1; (2) FPCR3.2; (3) FPCR3.3; (4) FPL29; (5) Marcador de peso para ADN.

Figura 4. (A) RCP con oligonucleótidos internos de cr3 y (B) Western blot de tres VVA recombinantes para CR3 independientes: (1) FPSCR3GPT.1; (2) FPSCR3GPT.2; (3) FPSCR3GPT.3; (4) virus parental; (5) Marcador de peso para ADN.

Figura 5. Chequeo de la estabilidad de la expresión de CR3 por Western blot. Los carriles representan tres muestras independientes de FEPs infectados con FPSCR3GPT del stock viral (1,2,3) ó del virus purificado por colchón de sacarosa (4,5,6). El carril 7 representa FEP infectadas con el virus parental.

Figura 6. Resultados de dos experimentos independientes de ELISPOT (Exp 1 y 2) a partir de esplenocitos de ratones inmunizados con FPSCR3gpt enfrentadas con P815 estimuladas con el péptido 32 ó VV recombinantes para CR3, Gag y Nef. Los valores netos se expresan como células secretoras

de IFN gamma por 10^6 esplenocitos, con los valores de los controles negativos restados (P815 solas ó infectadas con WR).

Figura 7. ELISPOT de IFN gamma con esplenocitos de ratones inmunizados con FPCR3 o FPSCR3gpt y P815 transfectados establemente con el gen cr3.

- 5 Los resultados se expresan como el número de células secretoras de IFN gamma por 10^6 esplenocitos. Los valores correspondientes a los controles negativos (P815 parental) han sido restados.

Figura 8. Reconocimiento de células B autólogas infectadas con VVCR3 por linfocitos CTL de 3 pacientes de SIDA. Se efectuó un ELISPOT para IFN γ y

- 10 los resultados se expresan como número de linfocitos secretores de IFN γ por millón de células.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención del gen cr3.

- El gen cr3 es un gen quimérico formado por fragmentos de diferentes genes del VIH-1 que contienen epitopos para células T. Para su construcción se partió de una banda sintética de ADN de 186pb que incluye las secuencias codificantes para: el epitopo T2 para células T auxiliaadoras (Th) de la gp120; la región V3 del aislamiento MN y epitopos para células Th de las proteínas gp41 y vpr en ese mismo orden. Estos fragmentos fueron previamente
- 20 amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa empleando los oligonucleotidos O.2660 y O.2661 para la RT, O.2662 y O.2663 para NEF y O.2664 y O.2665 para gag. (Tabla 1). Entre los distintos epitopos se intercalaron dos lisinas para facilitar el corte por proteasas intracelulares. Una secuencia roma por el 5' y un BamHI por el 3' permitió su clonación en
- 25 el plasmidio pTAB11 digerido EcoRV/BamHI, lo cual hace que, además, quede incluido en el 5' del gen la secuencia codificante para el epitopo T1 para células Th de la gp120. Sobre este nuevo plasmidio creado se clonaron a partir del epitopo de vpr los siguientes fragmentos: (1) la secuencia codificante para un fragmento de la enzima transcriptasa inversa (RT) del aislamiento SF2 (2662-3132), (2) un fragmento de la secuencia del gen *nef* del aislamiento LAI (8516-8839) y (3) un fragmento de la secuencia de Gag del aislamiento de SF2 (1451-1717), en ese orden. El plasmidio resultante se
- 30

le llamó pCR3, que codifica para una proteína con epitopos para células Th y citotóxicas (CTL) de las proteínas virales gp120, gp41, vpr, RT, Nef y Gag, presentados en una gama amplia de HLA (Tabla 2).

TABLA 1. SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS USADOS EN RCP

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
O.2660	GAAGATCTGTACAGAAATGGAAAAG
O.2661	GGAATTCTCGGATCCTACATAAAATCATC
O.2662	GACATCACAAGTAGCAATACAGC
O.2663	CCCTGCATGTGGCTCAACTGGTACTAGCTTG
O.2664	GTTGAGCCACATGCAGGGCCTATTGCAC
O.2665	GCTCTAGATTATTCGGCTCTTAGAGTTTTATAG
O.2666	GCTCTAGATTATTCGGCTCTTAGAG

5

TABLA 2. EPITOPOS PARA CELULAS T DESCRITOS EN CR3

	Epitopos	HLA I	HLAII
p24 87-175			
87-101	HAGPIAPGQMREPRG	A2	
91-110	IAPGQMREPRGSDIAGTTST	A2, A24, B13, B38	
101-120	GSDIAGTTSTLQEQIGWMTN	A26, A30, B38	
108-117	TSTLQEQIGW	B*5701, B*57, B*5801, B57, B58	
121-135	NPPIPVGEIYKRWII	B8	
121-142	NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIV	B8, B27, A33, B35	
122-130	PPIPVGEIY	B*3501	
124-138	IPVGEIYKRWIILGL	B8	
127-135	GEIYKRWII	B8	
128-136	EIYKRWIIL	B8, B*0801	
129-138	IYKRWIILGL	A*2402	
130-148	YKRWIILGLNKTVRMYSPT	B27	
1301-139	KRWIILGLN	B27	
134-143	IILGLNKIVR	A33	
136-145	LGLNKIVRMY	Bw62	
136-146	LGLNKIVRMY	B62	
137-145	GLNKIVRMY	B*1501, B62	
151-170	LDIRQGPKEPRDYVDRFYK	ND	
162-172	RDYVDRFYKTL	(B44, or A26, or B70), B*4402, A*2402	
166-174	DRFYKTLRA	B*1402, B14	
Nef 43-150			
68-76	FPVTPQVPL	B*3501, B35, B7	

68-77	FPVTPQVPLR	B7, B*0702	
71-79	TPQVPLRPM	B*0702	
74-81	VPLRPMTY	B35	
73-82	QVPLRPMTYK	A3; A11; B35	
74-81	VPLRPMTY	B35, B*3501	
75-82	PLRPMTYK	A*1101	
82-91	KAVDLSHFL	Cw8, C*0802	
83-94	AAVDLSHFLKEK	A11	
84-91	AVDLSHFL	Bw62	
84-92	AVDLSHFLK	A11, A*1101	
86-94	DLSHFLKEK	A3.1	
86-100	DLSHFLKEKGGLEGL	A2, B35, C4	
90-97	FLKEKGGL	B8	
92-100	KEKGGLEGL	B60, B*4001	
93-106	EKGGLEGLIHSQRR	A1, B8	
102-115	HSQRRQDILDWY	B7	
103-127	SQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNY	B13	
105-114	RRQDILDWY	B*2305	
106-115	RQDILDWY	B27	
115-125	YHTQGYFPDWQ	B17	
116-125	HTQGYFPDWQ	B57	
117-128	TQGYFPDWQNYT	B17; B37	
117-127	TQGYFPDWQNY	Bw62, B*1501	
120-128	YFPDWQNYT	B*3701, B*5701, B15, B37, B57	
120-144	YFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWYK	A24	
126-137	NYTPGPGVRYPLT	B7	
128-137	TPGPGVRYPLT	B*0702, B*4201, B7, B7(*8101)	
130-143	GPGVRYPLTFGWY	B*57	
132-147	GVRYPPLTFGWYKLV	B18, A1, B8	
133-148	VRYPLTFGWYKLV	B57	
135-143	YPLTFGWY	B*1801, B18, B35, B49	
136-145	PLTFGWYK	A*0201, A2	
RT 36-192			
36-52	EICTEMEKEGKISKIGP	ND	
42-50	EKEGKISKI	B*5101, B51	
93-101	GIPHPAGLK	A3	
98-113	AGLKKKSVTVLDVGD	Cw4	
103-107	KKSVTVLDVGDYFS	Cw4	
107-115	TVLDVGDY	B35, B*3501	
108-118	VLDVGDYFSV	A*0201, A2	
113-120	DAYFSVPL	B*5101, B24	

118-127	VPLDEDFRKY	B35, B*3501	
126-135	KYTAFTIPSI	A2	
128-135	TAFTIPSI	B51, B*5101	
151-159	QGWKGSPAI	B*5101	
153-165	WKGSPAIFQSSMT	B27	
156-164	SPAIFQSSM	B7, B35, B*3501	
158-166	AIFQSSMTK	A*0301, A*1101, A3, A*6801, A11, A3.1, B*0301	
175-142	KQNPDIVIY	A*3002	
177-185	NPDIVIQY	B35, B*3501	
181-189	VIYQYMDDL	A2, A*0201	
181-191	VIYQYMDDLIV	A*0201	
172-192	FRKQNPDIVIQYMDDLIVG		DR1,2 3,4,7 6
T1-T2 gp120			
421-440	KQIINMWQEVGKAMYAPPIE	A2	several
436-442	KVGKAMY	A2	
436-443	KVGKAMYA	A2	
105-117	HEDIISLWNQSLK	A2	several
115-123	IISLWNQSL	A2.1	
gp 41			
584-594	ERYLKDQQLLG	B14;B8; A24	
582-593	YLKDQQLL	B8, B*0801, A*2402	
580-593	ERYLKDQQLL	A*2402, B*0801, B8	
581-592	RYLKDQQL	B14, B*1402	
Vpr			
66-80	QLLFIHFRIGCRHSR		ND

Los números indican la localización del epítipo en la secuencia correspondiente a cada proteína del aislamiento HXB2; ND, no determinado.

Ejemplo 2. Clonaje de cr3 en el pFPL29.

- 5 En el pCR3, el gen cr3 quedó bajo el control del promotor Triptófano, con un sitio ClaI en el 5' y con el Terminador del gen 32 del fago T4 y un sitio HindIII por el 3'. El corte ClaI y HindIII, y tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I permitió obtener el gen con un ATG en su 5' y codones de parada de la traducción en el 3', para su clonación en el vector de poxvirus
- 10 pEFL29.

El pEFL29 tiene como región de homología para la recombinación con el genoma del Virus de Viruela Aviar (VVA), un fragmento terminal BamHI de

6kb. Este fragmento contiene tres marcos abiertos de lectura donde el ORF1 queda interrumpido. Flanqueados por esta región de homología se encuentran el promotor del virus vaccinia p7.5K, seguido por un sitio SmaI y el gen reportero LacZ bajo el control del promotor tardío 4b del VVA. El plasmidio presenta, además, el gen para la resistencia a kanamicina y un origen de replicación bacteriano.

Producto del ligamiento entre el vector pEFL29 cortado SmaI y tratado con fosfatasa alcalina y de una banda que contiene al gen cr3 por corte ClaI/HindIII y tratamiento posterior con Klenow, se obtuvieron clones con el gen cr3 en la orientación correcta, controlado por el promotor p7.5K. La cepa de E.coli DH5 α (ϕ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rK- mK+), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF)U169) se usó para la propagación y selección de los plasmidios recombinantes en medio de cultivo LB con kanamicina (25 μ g/ml). Todas las manipulaciones se hicieron siguiendo los protocolos de Sambrook y col (Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Sec Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)

Un clon recombinante, pEFL-cr3 (Figura 1), fue secuenciado de manera automática con un cebador de la banda sintética, usando el sistema Perkin-Elmer, que permitió verificar la unión por el extremo 5'. Este mismo clon fue purificado por el método del CsCl para los experimentos de transfección en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP).

Ejemplo 3. Clonaje de cr3 en pFP67xgpt.

El gen cr3 se amplificó por RCP y se clonó en un vector pMosblue (Amersham, UK). El plasmidio resultante se denominó pTCR3. El pTCR3 se digirió HpaI/BamHI y el gen cr3 se clonó en el vector de poxvirus pFP67xgpt

El pFP67xgpt tiene como región de homología para la recombinación con el genoma del VVA un fragmento de la región de 11.2 kb BamHI (Tomley F, Binns M, Campwell J, Boursnell M. Séquense Análisis of an 11.2 Kilobase, near-terminal, Bam HI fragment of foelpox virus, J Gen Virol, 1988, 69, 1025-1040). Este fragmento contiene los marcos de lectura abiertos 6 y 7 de dicha región de manera tal que la inserción se produce en la región intergénica.

Flanqueados por estas regiones de homología se encuentran un promotor sintético E/L (Carroll MW, Moss B. E. coli B-glucoronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses, Biotechniques, 1995, 19, 3: 352-354) y el gen reportero Ecogpt bajo el control del promotor 7.5K de vaccinia. El plasmidio además, presenta el gen para la resistencia a ampicilina y un origen de replicación bacteriano.

Producto del ligamiento entre el vector pFP67xgp cortado StuI/BamHI y de una banda que contiene al gen *cr3* por corte HpaI/BamHI se obtuvieron clones con el gen *cr3* controlado por el promotor sintético (Figura 1). La cepa de *E.coli* DH5 α (ϕ 80d*lacZ* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r_K⁺*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169) se usó para la propagación y selección de los plasmidios recombinantes en medio de cultivo LB con ampicilina (50 μ g/ml). Todas las manipulaciones se hicieron siguiendo los protocolos de Sambrook y cols.

Un clon recombinante, pFP67xgptctl, se secuenció y se purificó por el método del CsCl para los experimentos de transfección en cultivos primarios de FEP.

Ejemplo 4. Obtención de los VVA recombinantes para *cr3*.

Los FEP obtenidos de huevos embrionados libres de patógenos se infectaron con la cepa atenuada de VVA, FP9 a una multiplicidad de infección (m.o.i) de 2 ufp (unidades formadoras de placas) por célula, en frascos de cultivo de 25 cm² con medio medio 199 (Gibco, Grand Island, NY), con triptosa fosfato y sin suero fetal bovino.

La cepa HP-438, derivativa de la cepa patogénica HP-1, se obtuvo por seis pases en FEP, dos en membrana corioalantoidea y 438 pases en FEP (Mayr A and K Malicki. 1966. Attenuierung von virulentem Huhnerpockenvirus in Zellkulturen und Eigenschaften des attenuierten Virus. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B 13: 1-13). Una placa viral derivada de HP-438 y purificada dos veces fue pasada otras seis veces para constituir el stock viral de FP9. La secuencia completa del genoma viral de aproximadamente 266kb ha sido determinada recientemente. El virus fue crecido en medio 199 (Gibco, Grand Island, NY), con triptosa fosfato y 2% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY) (Medio de infección, MI).

- A las 2 h se añadió MI fresco, y se incubó durante otras 2h antes de proceder a la transfección de 10µg de pEFL-cr3 ó pFP67xgptctl con 20µg de Lipofectina siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Gibco, Grand Island, NY). Después de una incubación toda la noche a 37°C y 5% de CO₂,
- 5 se añadió MI fresco y se esperaron de tres a cuatro días hasta que apareció el efecto citopático en las células. Este efecto citopático se caracterizó por un redondeamiento de las células y, por tanto, pérdida de la morfología fibroblástica y un desprendimiento de la monocapa celular del plástico del frasco de cultivo.
- 10 Después de la liberación de los virus de las células por tres pasos de congelación-descongelación, se realizó una titulación seriada de los mismos desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶, en placas de 60 mm sembradas con FEP, para seleccionar los virus recombinantes. Cumplidas las 2h de adsorción viral en incubadora al 5% de CO₂ y 37°C, el inóculo se retiró y se colocó una capa de
- 15 medio con agarosa sobre la monocapa celular. Esta capa se preparó uniendo volúmenes iguales de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en agua y medio EMEM dos veces concentrado (Gibco, Grand Island, NY) con 4% de suero fetal bovino de recién nacido (Gibco, Grand Island, NY).
- Al cuarto día las placas virales fueron evidentes y en el caso de las células transfectadas con pEFL-cr3 se procedió a la tinción con medio selectivo poniendo una segunda capa de agarosa con medio EMEM y Xgal al 0.33% p/v. A las 24h las placas virales donde se expresó la β-Galactosidasa se
- 20 vieron azules. Debido a que tanto el gen reportero (*lacZ*) como el de interés se encuentran flanqueados por la misma región de homología, la obtención de placas virales azules es una evidencia de que existió recombinación y que
- 25 el gen de interés quedó insertado en el genoma del FP9. Las placas azules seleccionadas se purificaron cuatro veces por pases sucesivos en FEP hasta que se obtuvo un 100% de placas azules, sin mezcla con placas blancas, ya que estas son un indicio de contaminación con el virus parental FP9. Al VVA
- 30 recombinante obtenido se le llamó FPCR3 y a partir de una placa viral purificada cuatro veces se hizo un stock viral por infección de un frasco de 25 cm² con el cual se trabajó posteriormente.

En el caso de las transfecciones con pFP67xgptctl en el medio se incluyó ácido micofenólico (25 µg/ml), xantina (250 µg/ml) e hipoxantina (1 µg/ml). Al cuarto día las placas virales fueron evidentes. Debido a que tanto el gen reportero (*gpt*) como el de interés se encuentran flanqueados por la misma región de homología, la obtención de placas virales en medio selectivo es una evidencia de que existió recombinación y que el gen de interés quedó insertado en el genoma del FP9. Las placas azules seleccionadas se purificaron tres veces por pases sucesivos en FEP. Al VVA recombinante obtenido se le llamó FPSCR3GPT y a partir de una placa viral purificada cuatro veces se hizo un stock viral por infección de un frasco de 25 cm² con el cual se trabajó posteriormente.

Ejemplo 5. Chequeo por RCP de cr3 a partir de FEP infectados con FPCR3.

FPCR3 fue propagado en FEP durante 6 días. Las células infectadas fueron resuspendidas e incubadas por 2 h a 55 °C en 200 µL de Tampón de Extracción (10mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, 2 % β-mercaptoetanol) con 1.25 mg/ml de proteinasa K. Los ADN se extrajeron con fenol-cloroformo y se precipitaron con etanol absoluto. La presencia del gen cr3 se chequeó por RCP con los cebadores descritos a continuación, complementarios a las regiones 5' y 3' del sitio SmaI en el vector pEFL29, respectivamente. La secuencia de los cebadores es la siguiente:

cebador 775, 5' TATTAACATTGCCTAGTAG 3'

cebador 776, 5' GAAGTAGAATCATAAAGAAC 3'

Tres VVA independientes (FPCR3.1; FPCR3.2; FPCR3.3), recombinantes para CR3 mostraron una banda de alrededor de 1.3kb por RCP. El virus negativo FPL29 no mostró dicha banda (Figura 3A).

Ejemplo 6. Chequeo por RCP de cr3 a partir de FEP infectados con FPSCR3GPT.

FPSCR3gpt fue propagado en FEP durante 6 días. Las células infectadas fueron resuspendidas e incubadas por 2 h a 55 °C en 200 µL de Tampón de Extracción (10mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, 2 % β-

mercaptoetanol) con 1.25 mg/ml de proteinasa K. Los ADN se extrajeron con fenol-cloroformo y se precipitaron con etanol absoluto. La presencia del gen cr3 se chequeó por RCP con los cebadores con secuencias internas del gen. La secuencia de los cebadores es la siguiente:

- 5 cebador 2660, (257-279) 5' GAAGATCTGTACAGAAATGGAAAAG 3'
- cebador 2663, (1029-1059) 5' CCCTGCATGTGGCTCAACTGGTACTAGCTTG 3'

La amplificación por RCP de tres VVA independientes, recombinantes para CR3 (FPSCR3gpt.1; FPSCR3gpt.2; FPSCR3gpt.3) mostró una banda de la talla esperada de alrededor de 800 pb (figura 4A).

10 **Ejemplo 7. Evaluación de la expresión de CR3 a partir de FEP infectados con FPCR3.**

- Cultivos confluentes de FEP en placas de 60 mm fueron infectados con FPCR3 a una m.o.i de 0.5 ufp por célula. Después de 24 h, se colectaron las células en medio de cultivo, se centrifugaron y resuspendieron en Tampón de muestra 1X (50 mM Tris HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0.1 % bromofenol azul, 10% glicerol) para aplicar en una electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS al 15% (SDS-PAGE). Las muestras proteicas fueron fraccionadas en SDS-PAGE y electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, UK) siguiendo los protocolos establecidos. (ref Townbin). Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada toda la noche a 4 °C en 5% de leche descremada en Tampón Fosfato (PBS; 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 0.137 M NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄), y posteriormente incubada por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal 6.2 a una concentración final de 10 µg/ml. El anticuerpo monoclonal 6.2 (Iglesias y cols) fue producido en ratones y reconoce un epitopo de la gp120 dentro de la proteína CR3. Después de tres lavados la membrana se incubó con anti-IgG de ratón (1:1000) conjugada a peroxidasa de rábano picante (Sigma). Después de los lavados, la señal específica fue revelada usando un sistema de detección por quimoluminiscencia (ECL) de acuerdo a los protocolos del fabricante (Amersham, UK). Se detectó una proteína de peso molecular entre 50 y 64kDa en los cultivos infectados con FPCR3, siendo el virus FPCR3.1 el de mayor

expresión. No se detectó la proteína en cultivos infectados con el virus negativo, FPL29 (Figura 3B).

Ejemplo 8. Evaluación de la expresión de CR3 a partir de FEP infectados con FPSCR3GPT

- 5 Se infectaron cultivos confluentes de FEP en placas de 60 mm con FPSCR3GPT a un m.o.i de 1. Después de 24 h, se colectaron las células en medio de cultivo, se centrifugaron y resuspendieron en Tampón de muestra 1X (50 mM Tris HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0.1 % bromofenol azul, 10% glicerol) para aplicar en una electroforesis en geles de poliacrilamida y
- 10 SDS al 15% (SDS-PAGE). Las muestras proteicas fueron fraccionadas en SDS-PAGE y electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, UK) siguiendo los protocolos establecidos. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada toda la noche a 4 °C en 5% de leche descremada en Tampón Fosfato (PBS; 2.68 mM KCl, 1.47 mM
- 15 KH_2PO_4 , 0.137 M NaCl, 8.06 mM Na_2HPO_4), y posteriormente incubada por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal 6.2 a una concentración final de 10 µg/ml. El anticuerpo monoclonal 6.2 fue producido en ratones y reconoce un epitopo de la gp120 dentro de la proteína CR3. Después de tres lavados la membrana se incubó con anti-IgG de ratón
- 20 (1:1000) conjugada a peroxidasa de rábano picante (Sigma). Después de los lavados, la señal específica fue revelada usando un sistema de detección por quimo-luminiscencia (ECL) de acuerdo a los protocolos del fabricante (Amersham, UK). Se detectó una proteína de peso molecular entre 50 y 64 kD en los cultivos infectados con FPSCR3GPT. No se detectó la proteína en
- 25 cultivos infectados con el virus negativo (Figura 4B).

Ejemplo 9. Purificación de FPCR3 e inmunización de ratones.

- El FPCR3 ó el virus control negativo se purificaron por centrifugación de los extractos citoplasmáticos de FEP infectados con dichos virus a una m.o.i de 0.1 en un colchón de sacarosa al 25% (p/v) a 29000 rpm por 2 h. Cada lote
- 30 de virus purificado por colchón de sacarosa se tituló en FEP. La estabilidad de la expresión de CR3 se comprobó a partir de tres muestras independientes tanto del stock viral como de virus purificados por colchón de

sacarosa. Como se muestra en la Figura 5, la expresión de la proteína no varió después del escalado del proceso. Para ELISPOT, ratones Balb/c hembras de 5 a 6 semanas se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p) con un 2.5×10^7 ufp en 200 μ L de PBS estéril. Una segunda inmunización se realizó de la misma manera a los 21 días.

Ejemplo 10. Detección de la respuesta CTL mediante ensayo de ELISPOT

Siete días después de la última inmunización se extrajeron los bazo de los ratones de cada grupo, los cuales fueron macerados contra una malla metálica con ayuda de un émbolo de cristal y medio RPMI 1640 al 7% de suero fetal bovino (SFB). Después de un primer lavado, los eritrocitos se lisaron con 0.83% de NH_4Cl , y los esplenocitos se lavaron tres veces con RPMI 1640 al 7% de SFB. Para el ensayo de ELISPOT los esplenocitos se resuspendieron en RPMI 1640 con 10 % de SFB, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY) y 10 U/ml de Interleucina 2 humana (IL2h; Boheringer Mannheim, Germany).

Las células P815, presentadoras de antígenos en MHC clase 1, se cultivaron en DMEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10 % de SFB, 2 mM de glutamina y penicilina/estreptomicina, pero para los ensayos de ELISPOT se mantuvieron en el mismo medio que los esplenocitos.

El ensayo ELISPOT (del inglés "enzyme-linked-immunospots") se basa en la detección de células secretoras de $\text{IFN-}\gamma$, por la estimulación con células presentadoras de antígenos previamente tratadas con péptidos específicos o infectadas con virus vaccinia recombinantes (Tanguay S and JJ Killion. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. 1994. Lymphokine Cytokine Res, 13: 259-263). Placas de 96 pocillos con membrana Immubilon-P (MAIPS4510, Millipore, Molsheim, France) se recubrieron con 100 μ L de 5 μ g/ml de un anticuerpo monoclonal específico anti $\text{IFN-}\gamma$ murino, R4 (Pharminogen, San Diego, California) toda la noche a 4°C. Estas placas después de lavadas 3X con PBS, se bloquearon con RPMI 1640 al 10% de SFB a 37°C por 1h. Se adicionaron a los pocillos recubiertos con anti- $\text{IFN-}\gamma$, tres diluciones de

esplenocitos (10^6 , 2×10^5 , 4×10^4) junto con P815 estimuladas con $1 \mu\text{M}$ de un péptido específico del V3 del aislamiento MN ó infectadas con VVCR3, VVGag ó VVNef a una m.o.i de 5 ufp por célula. Los virus vaccinia recombinantes usados expresan CR3, Gag y Nef de BRU, respectivamente.

- 5 Las placas se incubaron a 37°C en 5 % de CO_2 , al menos 17 h. Células P815 sin tratar ó infectadas con un virus vaccinia control (WR salvaje) se incluyeron en el ensayo para estimar el número de células secretoras de $\text{IFN-}\gamma$ que existían como fondo de la técnica. Las placas se lavaron 3X con PBS y 5X con PBS-Tween20 (0.05%). Un segundo anticuerpo anti $\text{IFN-}\gamma$ conjugado
- 10 a biotina, XMG1.2 (Pharmingen, San Diego, California) se adicionó a una concentración de $0.5 \mu\text{g/ml}$ por 2h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-Tween20 y se añadió un conjugado Estreptavidina-peroxidasa (Amersham, UK) a una dilución 1:800 en PBS-Tween20 por 1h a temperatura ambiente. El ensayo fue revelado con 0.1% de 3,3'-diaminobencidina (Sigma, Saint Louis, USA) en Tris-HCl 50mM, pH 7.4 y 0.1% peróxido de hidrógeno por 15 min. Los pocillos se lavaron con agua
- 15 corriente y las manchas que indican las células, se contaron en un estereoscopio (Leica Microscopy System, Heerbrugg, Switzerland). Los resultados se expresan como número de células secretoras de $\text{IFN-}\gamma$ por 10^6 esplenocitos y el criterio de positividad es un valor dos veces mayor que su condición control (P815 sin péptidos ó infectadas con WR) y más de 50 células secretoras por 10^6 esplenocitos.

- Los resultados de dos ensayos independientes de ELISPOT se muestran en la Figura 6 Los esplenocitos de ratones Balb/c inmunizados con FPCR3 se
- 25 enfrentaron con células presentadoras P815 pulsadas con un péptido de 18 aminoácidos que contiene la secuencia del lazo V3 de la cepa MN, presente en CR3. La secuencia del péptido 32 es LKKKRIHIGPGRAFYERY. Los esplenocitos también se enfrentaron a P815 infectadas con los virus vaccinia recombinantes para CR3 (VVCR3), Gag (Vvgag) y Nef (VVNef). Como se
- 30 observa, en ambos experimentos se detectó respuesta CTL específica contra CR3 y los genes de VIH-1, evidenciada como un aumento en el número de células productoras de $\text{IFN-}\gamma$ en presencia de las células blanco que expresan estos antígenos.

En otro experimento se inmunizaron ratones Balb/c con FPCR3 o FPSCR3gpt de la forma antes descrita y la actividad CTL se estudió empleando como célula blanco la línea p815 establemente transfectada con el gen cr3 (P815cr3). Los resultados de este experimento se muestran en la figura 7. Los dos VVA recombinantes indujeron una fracción importante de células secretoras de IFN gamma específicas para CR3 (figura 7)

Ejemplo 11. Reconocimiento de células autólogas infectadas por Vaccinia CR3 por CTL de pacientes de SIDA.

Para evidenciar que el gen CR3 expresado por poxvirus es capaz de exponer eficientemente sus epitopos a los linfocitos CTL de pacientes infectados por el VIH, se infectaron células B autólogas de estos pacientes, previamente inmortalizadas con el Virus Epstein-Barr, con VV recombinante para CR3 (VVCR3). Estas células blancas se incubaron con linfocitos de sangre periférica de cada uno de los pacientes y los linfocitos secretores de IFN γ específicos para CR3 se cuantificaron por ELISPOT (Figura 8).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un gen quimérico que contiene fragmentos de diferentes genes del VIH-1,
5 donde estos fragmentos codifican para regiones ricas en epitopos para células T citotóxicas (CTL), los cuales son presentados por una amplia gama de antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad Humano tipo 1 (HLA-1), que pueden contener, además, epitopos seleccionados para células T auxiliaadoras (Th) del VIH-1 y al menos un epitopo B del VIH
10 reconocido por un anticuerpo monoclonal.
- 2.- Un gen como el de la reivindicación 1 el cual codifica para una poliproteína quimérica que contiene fragmentos de al menos una proteína estructural y una proteína no estructural VIH.
- 3.- Un gen como el de la reivindicación 2 que codifica para una poliproteína
15 quimérica que contiene fragmentos de las siguientes proteínas del VIH-1: transcriptasa inversa, P24 y Nef, epitopos Th de gp120, gp41 y vpr y una epitopo B de la gp120.
- 4.- Un gen como el de la reivindicación 3 que codifica para una poliproteína quimérica que contiene los fragmentos 203-259 de la transcriptasa inversa,
20 219-307 de P24, y 45-147 de la Nef., y los epitopos Th de T1 y T2 de gp120, 580-594 de gp41 y 566-580 de vpr y el epitopo V3 de la cepa MN reconocido por el AcM 2C4.
- 5.- El gen como el de la reivindicación 4 cuya secuencia corresponde esencialmente con la del gen *cr3*.
- 25 6.- Una proteína quimérica cuya secuencia de aminoácidos corresponde esencialmente con la codificada por el gen *cr3*.
- 7.- Un virus recombinante para un gen heterólogo que contiene fragmentos de diferentes genes del VIH-1, donde estos fragmentos codifican para regiones ricas en epitopos para células T citotóxicas (CTL), los cuales son
30 presentados por una amplia gama de antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad Humano tipo 1 (HLA-1), que pueden contener,

además, epitopos seleccionados para células T auxiliaadoras (Th) del VIH-1 y al menos un epitopo B del VIH reconocido por un anticuerpo monoclonal.

5 8.- Un virus recombinante como el de la reivindicación 7 donde el gen heterólogo codifica para una poliproteína quimérica que contiene fragmentos de al menos una proteína estructural y una proteína no estructural VIH.

10 9.- Un virus recombinante como el de la reivindicación 8 donde el gen heterólogo codifica para una poliproteína quimérica que contiene fragmentos de las siguientes proteínas del VIH-1: transcriptasa inversa, P24 y Nef, epitopos Th de gp120, gp41 y vpr y una epitopo B de la gp120

15 10.- Un virus recombinante como el de la reivindicación 9 donde el gen heterólogo codifica para una poliproteína quimérica que contiene los fragmentos 203-259 de la transcriptasa inversa, 219-307 de P24, y 45-147 de Nef., y los epitopos Th de T1 y T2 de gp120, 580-594 de gp41 y 566-580 de vpr y el epitopo V3 de la cepa MN reconocido por el AcM 2C4

11.- Un virus recombinante como el de la reivindicación 10 donde la secuencia del gen heterólogo corresponde esencialmente con la del gen *cr3*.

20 12.- El virus de la reivindicaciones 7- 11 donde este virus es un Poxvirus.

13.- El virus de las reivindicaciones 7 -12 donde este virus es un Avipoxvirus

14.- El virus de las reivindicaciones 7-13 donde este virus es el Virus de Viruela Aviar

25 15.- El virus de la reivindicación 7-14 donde este virus es el FPCR3.

16.- El virus de la reivindicación 7-14 donde este virus es el FPSCR3gpt.

17.- Una composición vacunal que contiene:

- un virus recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 7 - 16.

30 • un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 18.- El uso de una composición vacunal como la descrita en la reivindicación 17 para inducir una respuesta inmunológica contra diferentes proteínas del VIH-1 en personas sanas o pacientes de SIDA
- 19.- Una combinación terapéutica o preventiva compuesta por la
5 formulación vacunal descrita en la reivindicación 17 y un compuesto capaz de potenciar la respuesta inmune.
- 20.- Una combinación terapéutica o preventiva como la descrita en la reivindicación 19 donde el compuesto potenciador de la respuesta inmune es una citocina.
- 10 21.- Una combinación terapéutica o preventiva como la descrita en la reivindicación 20 donde la citosina es la IL2.
- 22.- Un plasmidio que contiene un gen quimérico como las reivindicaciones 1-5 bajo el control de un promotor de células de mamíferos.
- 23.- Una composición vacunal que contiene:
- 15 • un plasmidio recombinante de acuerdo con las reivindicación 22.
- un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 24.- El uso de una composición vacunal como la descrita en la reivindicación 23 para inducir una respuesta inmune contra diferentes
20 proteínas del VIH-1 en personas sanas o pacientes de SIDA
- 25.- Una combinación terapéutica o preventiva de la formulación vacunal descrita en la reivindicación 23 y un compuesto capaz de potenciar la respuesta inmune.
- 26.- Una combinación terapéutica o preventiva como la descrita en la
25 reivindicación 25 donde el compuesto potenciador de la respuesta inmune es una citocina.
- 27.- Una combinación terapéutica o preventiva como la descrita en las reivindicación 26 donde la citosina es la IL2.

1/7

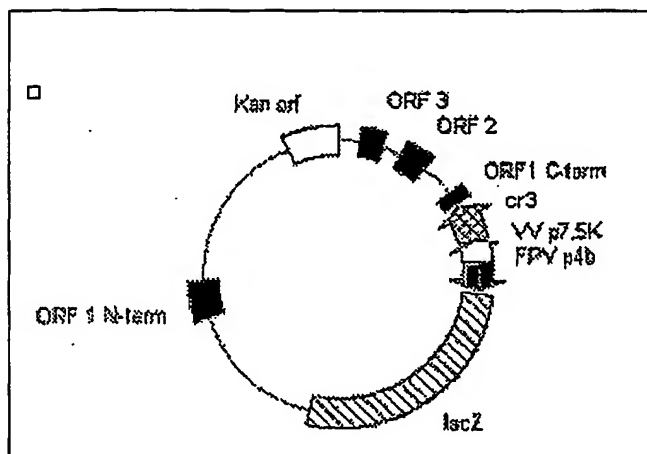


Figura 1

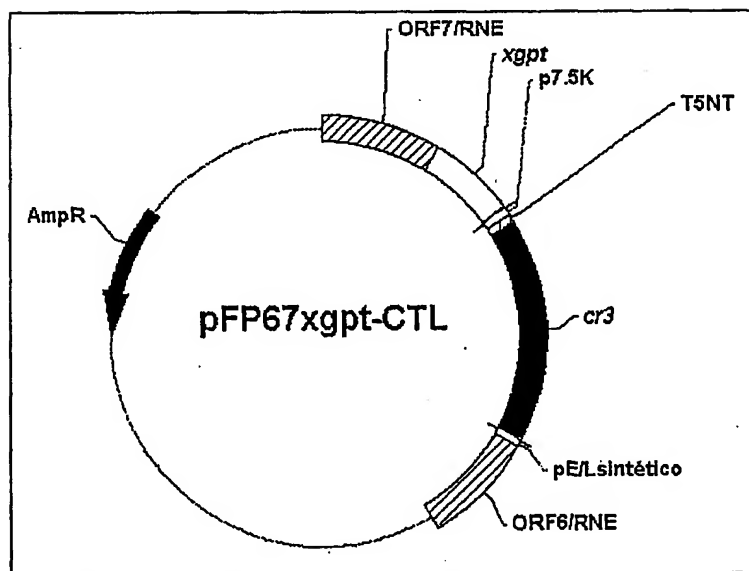


Figura 2

2/7

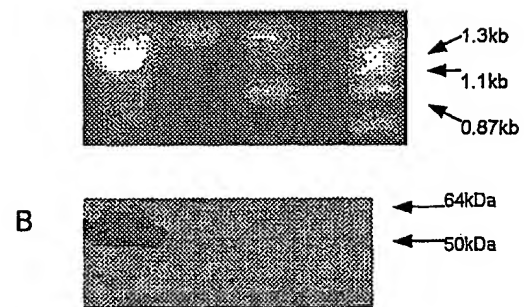


Figura 3

3/7

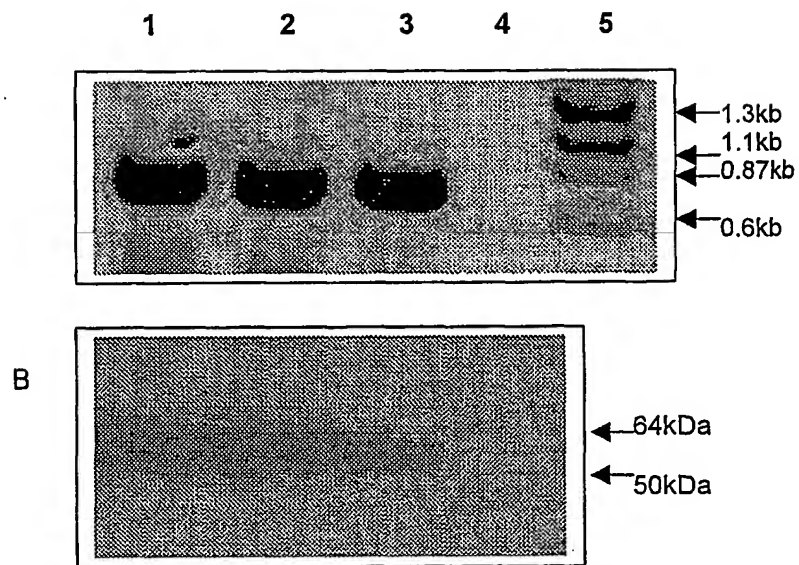


Figura 4.

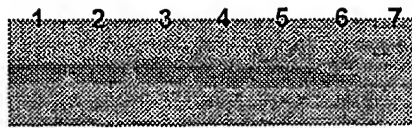


Figura 5

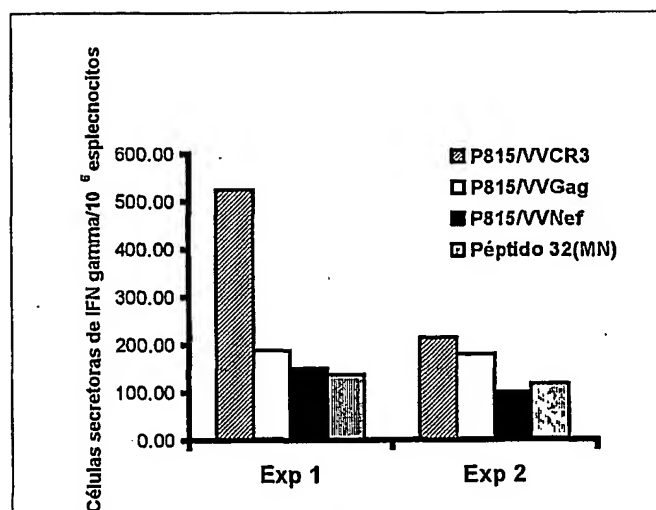


Figura 6

6/7

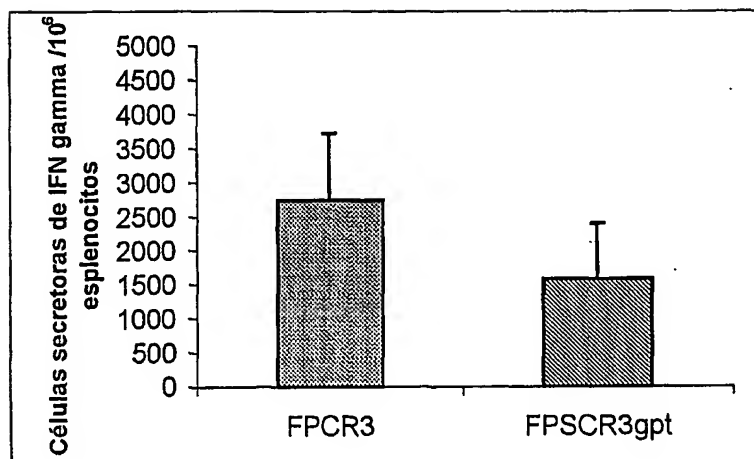


Figure 7

7/7

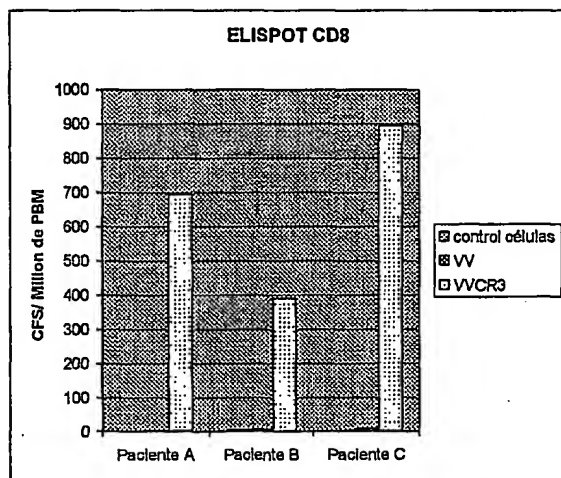


Figura 8

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

<120> POXVIRUS RECOMBINANTES PARA PROTEINAS QUIMERICAS DEL VIRUS
DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

<130> poxvirus

<150> CU 2001-0057

<151> 2001-02-28

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1333

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 1

atgcgtatca aacagattat caacatgtgg caggaagtgg gcaaagcgat gtatgccccg	60
ccgatttctg gtatggttga gcagatgcat gaagatatca ttagcctgtg ggaccagtct	120
cttaagaaaa agcgtatcca cattggccca ggccgtgcat tctatgaaag atacctaaag	180
gatcaacagc tcctagggaa aaagcaactg ctgtttattc atttcagaat tgggtgtcga	240
catagcagaa agaaagagat ctgtacagaa atggaaaagg aagggaat ttcaaaaatt	300
gggcctgaaa atccatacaa tactccagta tttgctataa agaaaaaga cagtactaaa	360
tggagaaaac tagtagattt cagagaactt aataaaagaa ctcaagactt ctgggaagt	420
cagttaggaa taccacaccc cgcagggtta aaaaagaaaa aatcagtaac agtattggat	480
gtgggtgatg catacttttc agttccctta gataaagact ttagaaagta tactgcattt	540
accataccta gtataaacia tgagacacca gggattagat atcagtacaa tgtgctgcca	600
cagggatgga aaggatcacc agcaatattc caaagtagca tgacaaaaat cttagagcct	660
tttagaaaac agaattccaga catagttatc tatcaataca tggatgattt gtatgtagga	720
tcggacatca caagtagcaa tacagcagct accaatgctg attgtgcctg gctagaagca	780
caagaggagg aggagatggg ttttccagtc acacctcagg tacctttaag accaatgact	840
tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta	900
attcactccc aacgaagaca agatatcctt gatctgtgga tctaccacac acaaggctac	960
ttccctgatt ggcagaacta cacaccaggg ccaggggtca gatatccact gacctttgga	1020
tgggtgctaca agctagtacc agttgagcca catgcagggc ctattgcacc aggccaaatg	1080
agagaaccaa ggggaagtga catagcagga actactagta cccttcagga acaaatagga	1140
tggatgacaa ataattccacc tatcccagta ggagaaatct ataaaagatg gataatcctg	1200
ggattaaata aaatagtaag aatgtatagc cctaccagct ttctggacat aagacaagga	1260
ccaaaggaac cctttagaga ttatgtagac cggttctata aaactctaag agccgaataa	1320
tctagaacgg atc	1333